

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 DF40PCT/B558	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/02687	国際出願日 (日.月.年) 25.04.00	優先日 (日.月.年) 26.04.99
出願人(氏名又は名称) 味の素株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> C07K 5/083

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> C07K 5/083

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 90/12814, A (MOUNT SINAI SCHOOL MEDICINE) 1. 11月. 1990 (01. 11. 90) & EP, 469084, A & JP, 4-504858, A & US, 5208217, A	1-11
Y	J. MARK QUILLAN et al., "Combinatorial diffusion assay used to identify topically active melanocyte-stimulating hormone receptor antagonists", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (March 1995), Vol. 92, p. 2894-2898	1-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 06. 00

国際調査報告の発送日

11.07.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

光本 美奈子

4B

9359

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 98/21229, A1 (THERAMEX LAB SA) 22. 5月. 1998 (22. 05. 98) & EP, 842946, A1	1 - 1 1
A	EP, 93551A (AJINOMOTO CO INC) 9. 11月. 1983 (09. 11. 83) & US, 4650785, A & JP, 5-18813, B1	1 - 1 1



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02687

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K 5/083

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K 5/083

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 9012814, A (MOUNT SINAI SCHOOL MEDICINE), 01 November, 1990 (01.11.90) & EP, 469084, A & JP, 4504858, W & US, 5208217, A	1-11
Y	J.MARK QUILLAN et al, "Combinatorial diffusion assay used to identify topically active melanocyte-stimulating hormone receptor antagonists"(March 1995) vol.92, pp.2894-2898	1-11
A	WO, 9821229, A1 (THERAMEX LAB SA), 20 May, 1998 (20.05.98) & EP, 842946, A1	1-11
A	EP, 93551, A (AJINOMOTO CO INC) 09 November, 1983 (09.11.83) & US, 4650785, A & JP, 5-18813, B1	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing  
date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means  
"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
28 June, 2000 (28.06.00)

Date of mailing of the international search report  
11 July, 2000 (11.07.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.





## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C07K 5/083

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C07K 5/083

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 90/12814, A (MOUNT SINAI SCHOOL MEDICINE) 1. 11月. 1990 (01. 11. 90) & EP, 469084, A & JP, 4-504858, A & US, 5208217, A	1-11
Y	J. MARK QUILLAN et al., "Combinatorial diffusion assay used to identify topically active melanocyte-stimulating hormone receptor antagonists", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (March 1995), Vol. 92, p. 2894-2898	1-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 06. 00

国際調査報告の発送日

11.07.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

光本 美奈子

4B

9359

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 98/21229, A1 (THERAMEX LAB SA) 22.5月.1998 (22.05.98) & EP, 842946, A1	1-11
A	EP, 93551A (AJINOMOTO CO INC) 9.11月.1983 (09.11.83) & US, 4650785, A & JP, 5-18813, B1	1-11

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMOKOSHI, Masao  
9th Fl., Taka-ai Bldg., 15-2,  
Nihombashi 3-chome  
Chuo-ku, Tokyo 103-0027  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 02 November 2000 (02.11.00)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference DF40PCT/B558 ✓			
International application No. PCT/JP00/02687 ✓	International filing date (day/month/year) 25 April 2000 (25.04.00) ✓	Priority date (day/month/year) 26 April 1999 (26.04.99) ✓	
Applicant AJINOMOTO CO., INC. et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

KR,US  
✓ ✓

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

CN,EP,JP  
✓ ✓ ✓

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 02 November 2000 (02.11.00) under No. WO 00/64926

**REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)**

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

**REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))**

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

SHIMOKOSHI, Masao  
9th Fl., Taka-ai Bldg., 15-2,  
Nihombashi 3-chome  
Chuo-ku, Tokyo 103-0027  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 16 May 2000 (16.05.00)	
Applicant's or agent's file reference DF40PCT/B558	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/02687	International filing date (day/month/year) 25 April 2000 (25.04.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 26 April 1999 (26.04.99)
Applicant AJINOMOTO CO., INC. et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
26 April 1999 (26.04.99)	11/118633	JP	05 May 2000 (05.05.00)

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Susumu Kuba

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Telephone No. (41-22) 338.83.38



特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 18 MAY 2001

WIPO

PCT

出願人又は代理人 DF40PCT/B の書類記号 558	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/02687	国際出願日 (日.月.年) 25.04.00	優先日 (日.月.年) 26.04.99
国際特許分類(IPC) Int.Cl <sup>7</sup> C07K5/083		
出願人(氏名又は名称) 味の素株式会社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。  
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で                      ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  
I ☒ 国際予備審査報告の基礎  
II ☐ 優先権  
III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成  
IV ☐ 発明の単一性の欠如  
V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明  
VI ☐ ある種の引用文献  
VII ☐ 国際出願の不備  
VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 18.08.00	国際予備審査報告を作成した日 27.04.01		
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 鈴木 恵理子 印	4N	8114
電話番号 03-3581-1101 内線 3488			

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)





## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-11	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-11	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-11	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

## 請求の範囲1-11について

国際調査報告で引用した文献2(Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1995), Vol. 92, p. 28 94-2898)には、メラノサイト刺激ホルモン阻害剤としてのD-Trp-Arg-Leu-NH<sub>2</sub>が記載されている。不安定なアミノ酸であるTrpに代え、ナフチルアラニンを用いることは、同文献1(WO, 90/12814, A(MOUNT SINAI SCHOOL MEDICINE)1.11月.1990(01.11.90))に、置換アミノ酸として用いるための大きな疎水性残基を有するアミノ酸として、Trpとナフチルアラニンが並列して記載されており、上記文献2に記載のTrpに代え、ナフチルアラニンを用いて安定化させることは、上記文献1の記載から当業者が容易に想到し得たことであり、請求の範囲1-11の発明には、進歩性がない。



## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference DF40PCT/B558	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/02687	International filing date (day/month/year) 25 April 2000 (25.04.00)	Priority date (day/month/year) 26 April 1999 (26.04.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 5/083		
Applicant AJINOMOTO CO., INC.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 18 August 2000 (18.08.00)	Date of completion of this report 27 April 2001 (27.04.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/02687

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

- These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/JP 00/02687

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-11	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

Claims 1-11

Document 2 cited in the international search report (Proc. Natl. Acad. Sci., USA (1995), Vol. 92, pp. 2894-2898) discloses D-Trp-Arg-Leu-NH<sub>2</sub> as a melanocyte-stimulating hormone inhibitor. As regards the use of naphthylalanine instead of the unstable amino acid Trp, Document 1 cited in the international search report (WO, 90/12814, A (Mount Sinai School of Medicine), 1 November 1990 (01.11.90)) associates Trp and naphthylalanine as amino acids having bulky hydrophobic residues for use as substituent amino acids, so that a person skilled in the art could easily conceive of improving stability by using naphthylalanine instead of Trp as disclosed in Document 2. Therefore, the invention described in Claims 1-11 does not involve an inventive step





<b>(51) 国際特許分類</b> <b>C07K 5/083</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO00/64926</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 2000年11月2日(02.11.00)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP00/02687  <b>(22) 国際出願日</b> 2000年4月25日(25.04.00)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平11/118633                      1999年4月26日(26.04.99)                      JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.)[JP/JP] 〒104-8315 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 塩尻栄二(SHIOJIRI, Eiji)[JP/JP] 瀧野嘉延(TAKINO, Yoshinobu)[JP/JP] 中條博美(CHUJOU, Hiromi)[JP/JP] 坂本一民(SAKAMOTO, Kazutami)[JP/JP] 岩崎敬治(IWASAKI, Keiji)[JP/JP] 〒210-8681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 アミノサイエンス研究所内 Kanagawa, (JP) 伊地知千織(IJICHI, Chiori)[JP/JP] 江藤 譲(ETO, Yuzuru)[JP/JP] 〒210-8681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 医薬研究所内 Kanagawa, (JP)		<b>(74) 代理人</b> 霜越正夫, 外(SHIMOKOSHI, Masao et al.) 〒103-0027 東京都中央区日本橋三丁目15番2号 高愛ビル9階 Tokyo, (JP)  <b>(81) 指定国</b> CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)  添付公開書類 国際調査報告書
<b>(54) Title:    MELANOCYTE-STIMULATING HORMONE INHIBITORS</b>  <b>(54) 発明の名称</b> メラノサイト刺激ホルモン阻害剤  <b>(57) Abstract</b> Melanocyte-stimulating hormone inhibitors characterized by containing, as the active ingredient, di- or tripeptide derivatives having a specific naphthyl group or salts thereof, or a melanocyte-stimulating hormone inhibiting compound showing a 50% inhibitory concentration (IC <sub>50</sub> ) on cAMP production of 100 nm or less. These inhibitors can inhibit pigmentation, prevent, ameliorate or treat immunopathy or immunodeficiency, or regulate body weight by controlling appetite. These inhibitors are usable in cosmetics and skin preparations for external use. Moreover, they can be easily produced and have a high storage stability.		

本願明細書には、特定のナフチル基を有するジまたはトリペプチド誘導体もしくはその塩、またはcAMP産生50%阻害濃度(IC50)が100nM以下であるメラノサイト刺激ホルモン阻害化合物を有効成分として含有することを特徴とする、メラノサイト刺激ホルモン阻害剤が開示され、このメラノサイト刺激ホルモン阻害剤は、色素沈着を防止し、あるいは免疫異常症や免疫不全症を予防、改善または治療し、あるいは食欲調節による体重の制御をすることができ、化粧品や皮膚外用剤として用いることができ、しかも容易に製造でき、かつ保存安定性に優れたものである。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	MN	モンゴル	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MX	メキシコ	US	米国
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MZ	モザンビーク	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CZ	チェンコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

## 明細書

## メラノサイト刺激ホルモン阻害剤

## (技術分野)

本発明は、メラノサイト刺激ホルモン阻害能を有する新規ペプチド誘導体及びメラノサイト刺激ホルモン阻害剤、並びにそれらを含む美白剤、免疫機能調節剤、食欲調節剤、化粧品、および皮膚外用剤に関する。

## (背景技術)

メラノサイト刺激ホルモンは、人や動物の皮膚や毛の色の制御に関与しており、人の皮膚の色を黒くすることが知られている（例えば、Nature (1961) 189, 176-179）。その作用の要因としてメラノサイト刺激ホルモンがメラノサイトの増殖を促進するとともに、メラニンの生合成酵素であるチロシナーゼを活性化することが報告されている（Proc. Natl. Acad. Sci. (1995) 92, 1789-1793）。一方、メラノサイト刺激ホルモンは、皮膚表皮細胞が産生し、その産生量は紫外線照射により大きく上昇することが知られている（ACTH Relat. Pept. (1995) 6, 63-68）。これらのことより、メラノサイト刺激ホルモンは紫外線による日焼けの後の色素沈着の要因になっていると考えられる。

メラノサイト刺激ホルモンの上記以外の作用として、マクロファージの一酸化窒素産生抑制やIL-10を介した免疫抑制作用（例えばImmunology Today (1997) 18, 140-145）及び、食欲調節作用（例えばAm. J. Physiol. 274 Endocrinol. Metab. 37 (1998) E627-E633）が知られている。

以上のことより、メラノサイト刺激ホルモンの生成を抑制あるいはその働きを阻害することができれば、紫外線による色素沈着の防止、あるいは免疫異常症や免疫不全症の予防、改善または治療、あるいは食欲調節による体重の制御をすることができる。

従来、メラノサイト刺激ホルモン阻害剤としては、His-D-Arg-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> (Peptides (1994) 15, 627-632) や D-Trp-Arg-Leu-NH<sub>2</sub> (Proc. Natl. Acad. Sci. (1995) 92, 2894-2898) 等が知られている。しかし、これらの阻害剤はいずれのペプチドも不安定なアミノ酸であるトリプトファンを含有しており、保存安定性が悪いという問題があった。また、これらは、爬虫類の皮膚や両生類の色素細胞を脱色することは知られているが、人の皮膚の色素沈着の原因であるメラニン生成やチロシナーゼのメラノサイト刺激ホルモンによる活性化を抑制する作用を有するか否かは明らかにされていない。

また、その他のメラノサイト刺激ホルモン阻害剤としては、アグウチタンバク質やその断片ペプチドが色素沈着抑制作用を有することが知られているが (WO 97/00892)、製造が容易でなく、さらに保存安定性が悪いという問題があった。

さらに、細胞を用いた評価によって色素細胞を脱色する等の効果を有するメラノサイト刺激ホルモン阻害剤であっても、これらを実際の生体に適用した場合には、色素沈着抑制効果あるいは免疫異常症や免疫不全症の予防、改善または治療効果、あるいは食欲調節による体重の制御をすることができる等の効果があっても、その効果が弱いか若しくは効果の発現に時間を要するという問題があった。

#### (発明の開示)

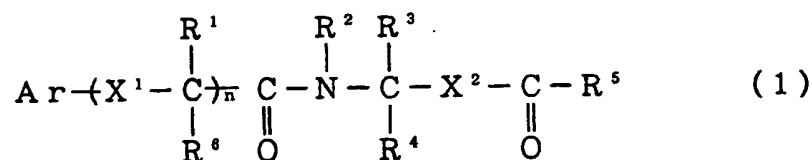
前項記載の従来技術の背景下に、本発明の第1の課題は、メラノサイト刺激ホルモンの働きを阻害し、延いては色素沈着を防止し、あるいは免疫異常症や免疫不全症を予防、改善または治療し、あるいは食欲調節による体重の制御をすることができ、また化粧品や皮膚外用剤として用いることができ、しかも容易に製造でき、かつ保存安定性に優れる新規ペプチド誘導体を提供することにある。

また、本発明の第2の課題は、実際の生体に適用した場合にも顕著に良好な色素沈着抑制効果を有し、あるいは免疫異常症や免疫不全症の予防、改善または治療に有効な、あるいは食欲調節による体重の制御をすることができ、また化粧品

や皮膚外用剤として用いることができるメラノサイト刺激ホルモン阻害剤を提供することにある。

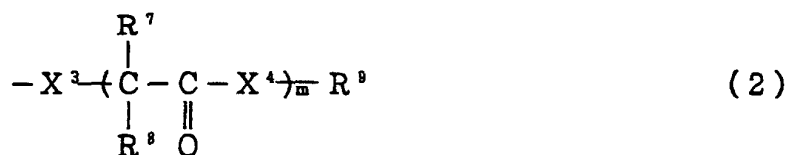
本発明者らは、上記第1の課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、下記一般式(1)で表される新規ペプチド誘導体またはその塩によれば上記第1の課題を解決することができることを見だし、このような知見に基づいて本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、下記一般式(1)で表されることを特徴とするナフチル基を有するジまたはトリペプチド誘導体またはその塩に関する。



(式中、Arは、置換基を有していてもよいナフチル基を、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>は、それぞれ独立に水素原子または置換基を有していてもよい炭素原子数1～6の直鎖または分岐のアルキル基を、R<sup>4</sup>は、水素原子、置換基を有していてもよい、アミノ酸の側鎖、アミノ基、アミジノ基、グアニジル基、炭素原子数1～6の直鎖若しくは分岐のアミノアルキル基、炭素原子数1～6の直鎖若しくは分岐のアミジノアルキル基、炭素原子数1～6の直鎖若しくは分岐のグアニジノアルキル基または炭素原子数6～12のアミジノアリアル基を、X<sup>1</sup>は、存在しないかまたは炭素原子数1～6のアルキレン基、置換基として炭素原子数1～6の直鎖若しくは分岐のアルキル基を有していてもよい炭素原子数1～6のアミノアルキレン基、または炭素原子数1～6の直鎖若しくは分岐のオキシアアルキレン基を、X<sup>2</sup>は、存在しないかまたは炭素原子数1～6の直鎖若しくは分岐のアルキレン基を、R<sup>6</sup>は、水素原子または-NHYを、Yは水素原子、炭素原子数2～22のアシル基、炭素原子数1～22のアルキル基、炭素原子数1～22のヒドロキシアアルキル基、または炭素原子数1～22のアルコキシル基を有する3-アルコキシ-2-ヒドロキシプロピル基を、nは、0または1の整数を、そしてR<sup>5</sup>は、下記一般式

(2) で表される基を示す。



式中、 $\text{X}^3$ は、 $-\text{O}-$ または $-\text{NR}^{10}-$ を、 $\text{X}^4$ は、 $-\text{O}-$ または $-\text{NR}^{11}-$ を、 $\text{R}^7$ は、水素原子、アミノ酸の側鎖または炭素原子数1～6の直鎖若しくは分岐のアルキル基を、 $\text{R}^8$ 、 $\text{R}^{10}$ および $\text{R}^{11}$ は、それぞれ独立に水素原子または炭素原子数1～6の直鎖若しくは分岐のアルキル基を、 $\text{R}^9$ は、水素原子、炭素原子数2～22のアシル基、炭素原子数1～22のアルキル基、炭素原子数1～22のヒドロキシアルキル基、または炭素原子数1～22のアルコキシル基を有する3-アルコキシ-2-ヒドロキシプロピル基を、そして $m$ は0または1の整数を表す。)

尚、上記一般式(1)で表されるペプチド誘導体は、文献未収載の新規化合物である。

また、本発明者らは、上記第2の課題、すなわち、実際に生体に適用した場合に色素沈着抑制剤等の効果を顕著に有するものを見出すべく鋭意研究を重ねた結果、一定のcAMP産生阻害作用を有するメラノサイト刺激ホルモン阻害能を有する化合物が上記第2の課題を解決することを見だし、本発明を完成するに至った。因みに、このような化合物は、上記一般式(1)で表されるペプチド誘導体またはその塩に包含されるものに限られない。

すなわち、本発明は、cAMP産生50%阻害濃度(IC50)が100nM以下であるメラノサイト刺激ホルモン阻害能を有する化合物を有効成分とするメラノサイト刺激ホルモン阻害剤に関する。

また、本発明は、上記一般式(1)で示されるペプチド誘導体またはその塩から選ばれる少なくとも一種を有効成分として含有することを特徴とするメラノサイト刺激ホルモン阻害剤に関する。



さらに、本発明は、このようなメラノサイト刺激ホルモン阻害剤またはcAMP産生50%阻害濃度(IC50)が100nM以下であるメラノサイト刺激ホルモン阻害能を有する化合物の少なくとも1種を有効成分として含有する美白剤、免疫機能調節剤、食欲調節剤、化粧品または皮膚外用剤に関する。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の一般式(1)で表されるペプチド誘導体及びその塩においては、R<sup>6</sup>は前記のように定義されるが、これがNHYのときのYの具体例として、例えば、水素原子、アセチル基、プロピオイル基、イソプロピオイル基、n-ブチロイル基、イソブチロイル基、sec-ブチロイル基、tert-ブチロイル基、n-アミロイル基、sec-アミロイル基、tert-アミロイル基、イソアミロイル基、n-ヘキシロイル基、シクロヘキシロイル基、n-ヘプタノイル基、n-オクタノイル基、2-エチルヘキシロイル基、ノニオイル基、イソノニオイル基、デカノイル基、イソデカノイル基、ウンデカノイル基、ラウロイル基、トリデカノイル基、イソトリデカノイル基、ミリストイル基、バルミトイル基、イソバルミトイル基、ステアロイル基、イソステアロイル基、オレオイル基、ドコサノイル基、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、n-アミル基、sec-アミル基、tert-アミル基、イソアミル基、n-ヘキシル基、シクロヘキシル基、n-ヘプチル基、n-オクチル基、2-エチルヘキシル基、ノニル基、イソノニル基、デシル基、イソデシル基、ウンデシル基、ラウリル基、トリデシル基、イソトリデシル基、ミリスチル基、セチル基、イソセチル基、ステアリル基、イソステアリル基、オレイル基、ベヘニル基、2-ヒドロキシエチル基、2-ヒドロキシプロピル基、2-ヒドロキシイソプロピル基、2-ヒドロキシ-n-ブチル基、2-ヒドロキシイソブチル基、2-ヒドロキシ-sec-ブチル基、2-ヒドロキシ-tert-ブチル基、2-ヒドロキシ-n-アミル基、2-ヒドロキシ-sec-アミル基、2-ヒドロキシ-tert-アミル基、2-ヒドロキシイソア

ミル基、2-ヒドロキシ-n-ヘキシル基、2-ヒドロキシシクロヘキシル基、  
2-ヒドロキシ-n-ヘプチル基、2-ヒドロキシ-n-オクチル基、2-ヒド  
ロキシ-2-エチルヘキシル基、2-ヒドロキシノニル基、2-ヒドロキシイソ  
ノニル基、2-ヒドロキシデシル基、2-ヒドロキシイソデシル基、2-ヒドロ  
キシウンデシル基、2-ヒドロキシラウリル基、2-ヒドロキシトリデシル基、  
2-ヒドロキシイソトリデシル基、2-ヒドロキシミリスチル基、2-ヒドロキシ  
セチル基、2-ヒドロキシイソセチル基、2-ヒドロキシステアリル基、2-  
ヒドロキシイソステアリル基、2-ヒドロキシオレイル基、2-ヒドロキシベヘ  
ニル基、3-メトキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-エトキシ-2-ヒドロ  
キシプロピル基、3-プロピオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-イソプロ  
ピオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-n-ブトキシ-2-ヒドロキシプロ  
ピル基、3-イソブトキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-sec-ブトキシ  
-2-ヒドロキシプロピル基、3-tert-ブトキシ-2-ヒドロキシプロピ  
ル基、3-n-アミルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-sec-アミル  
オキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-tert-アミルオキシ-2-ヒドロ  
キシプロピル基、3-イソアミルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-n-  
ヘキシルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-シクロヘキシルオキシ-2-  
ヒドロキシプロピル基、3-n-ヘプチルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、  
3-n-オクチルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-(2-エチルヘキシ  
ル)オキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-ノニルオキシ-2-ヒドロキシプ  
ロピル基、3-イソノニルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-デシルオキ  
シ-2-ヒドロキシプロピル基、3-イソデシルオキシ-2-ヒドロキシプロピ  
ル基、3-ウンデシルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-ラウリルオキシ  
-2-ヒドロキシプロピル基、3-トリデシルオキシ-2-ヒドロキシプロピル  
基、3-イソトリデシルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-ミリスチルオ  
キシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-セチルオキシ-2-ヒドロキシプロピル  
基、3-イソセチルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-ステアリルオキシ

ー2ーヒドロキシプロピル基、3ーイソステアリルオキシー2ーヒドロキシプロピル基、3ーオレイルオキシー2ーヒドロキシプロピル基、3ーベヘニルオキシー2ーヒドロキシプロピル基等を挙げることができる。

前記のように定義されるArとX<sup>1</sup>との結合位置は特に限定されるものではなく任意に選ぶことができる。そして、これらの基の芳香環に結合した水素原子は、1個または複数個がハロゲン原子、炭素原子数1～6のアルキル基、ヒドロキシル基、炭素原子数1～6のヒドロキシアルキル基、ニトロ基、炭素原子数1～6のアルコキシル基またはカルボキシル基、あるいはスルホン酸で置換されていてもよい。水素原子が複数個の基で置換されている場合、複数の置換基は同一であっても異なってもよい。

Arの母骨格としては、1ーナフチル基または2ーナフチル基を挙げることができる。

前記のように定義されるR<sup>4</sup>の具体例としては、例えば、グルタミン酸、アスパラギン酸、システイン酸、ホモシステイン酸等の酸性アミノ酸、アラニン、βーアラニン、2ーアミノ酪酸、バリン、ノルバリン、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、フェニルグリシン、スレオニン、セリン、ホモセリン、チロシン、ドーバ、システイン、メチオニン、グルタミン、アスパラギン等の中性アミノ酸、リジン、ホモリジン、オルニチン、アルギニン、ホモアルギニン、ヒスチジン等の塩基性アミノ酸の側鎖（アミノ酸からC（COOH）NH<sub>2</sub>を除いた残基）、又は、水素原子を挙げることができる。これらの中で、塩基性アミノ酸の側鎖がより好ましい。アミノ酸側鎖の他には、アミジノ基を有するアミジノエチル、アミジノプロピル、アミジノブチル、アミジノペンチル、アミジノヘキシル、アミジノフェニル等を挙げることができる。

一般式（2）における、前記のように定義されるR<sup>7</sup>の具体例としては、例えば、グルタミン酸、アスパラギン酸、システイン酸、ホモシステイン酸等の酸性アミノ酸、アラニン、βーアラニン、2ーアミノ酪酸、バリン、ノルバリン、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、フェニルグリシン、トリ

プトファン、スレオニン、セリン、ホモセリン、チロシン、ドーバ、システイン、メチオニン、グルタミン、アスパラギン等の中性アミノ酸、リジン、ホモリジン、オルニチン、アルギニン、ホモアルギニン、ヒスチジン等の塩基性アミノ酸の側鎖又は、水素原子を挙げることができる。これらの中で、疎水性側鎖を有する中性アミノ酸の側鎖がより好ましい。

前記のように定義されるR<sup>9</sup>の具体例としては、例えば水素原子、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基、*n*-アミル基、*sec*-アミル基、*tert*-アミル基、イソアミル基、*n*-ヘキシル基、シクロヘキシル基、*n*-ヘプチル基、*n*-オクチル基、2-エチルヘキシル基、ノニル基、イソノニル基、デシル基、イソデシル基、ウンデシル基、ラウリル基、トリデシル基、イソトリデシル基、ミリスチル基、セチル基、イソセチル基、ステアリル基、イソステアリル基、オレイル基、ベヘニル基、2-ヒドロキシエチル基、2-ヒドロキシプロピル基、2-ヒドロキシイソプロピル基、2-ヒドロキシ-*n*-ブチル基、2-ヒドロキシイソブチル基、2-ヒドロキシ-*sec*-ブチル基、2-ヒドロキシ-*tert*-ブチル基、2-ヒドロキシ-*n*-アミル基、2-ヒドロキシ-*sec*-アミル基、2-ヒドロキシ-*tert*-アミル基、2-ヒドロキシイソアミル基、2-ヒドロキシ-*n*-ヘキシル基、2-ヒドロキシシクロヘキシル基、2-ヒドロキシ-*n*-ヘプチル基、2-ヒドロキシ-*n*-オクチル基、2-ヒドロキシ-2-エチルヘキシル基、2-ヒドロキシノニル基、2-ヒドロキシイソノニル基、2-ヒドロキシデシル基、2-ヒドロキシイソデシル基、2-ヒドロキシウンデシル基、2-ヒドロキシラウリル基、2-ヒドロキシトリデシル基、2-ヒドロキシイソトリデシル基、2-ヒドロキシミリスチル基、2-ヒドロキシセチル基、2-ヒドロキシイソセチル基、2-ヒドロキシステアリル基、2-ヒドロキシイソステアリル基、2-ヒドロキシオレイル基、2-ヒドロキシベヘニル基、3-メトキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-エトキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-プロピオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-イソプロピオキシ-2-

ーヒドロキシプロピル基、3-*n*-ブトキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-イソブトキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-*sec*-ブトキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-*tert*-ブトキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-*n*-アミルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-*sec*-アミルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-*tert*-アミルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-イソアミルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-*n*-ヘキシルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-シクロヘキシルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-*n*-ヘプチルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-*n*-オクチルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-(2-エチルヘキシル)オキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-ノニルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-イソノニルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-デシルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-イソデシルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-ウンデシルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-ラウリルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-トリデシルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-イソトリデシルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-ミリスチルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-セチルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-イソセチルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-ステアリルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-イソステアリルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-オレイルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基、3-ベヘニルオキシ-2-ヒドロキシプロピル基等を挙げることができる。

上記一般式(1)で表されるペプチド誘導体の各アミノ酸残基は、光学活性体またはラセミ体のいずれでも良い。

上記一般式(1)で表される化合物の塩の具体例としては、例えば、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属塩、マグネシウム、カルシウム等のアルカリ土類金属塩、アンモニア等の無機塩、モノエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール、2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール、リジン、オルニチン、アルギニン

等の有機アミン塩、塩素、臭素、ヨウ素等のハロゲン塩、塩酸塩、硫酸塩、炭酸塩、リン酸塩、等の無機酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、グリコール酸塩、リンゴ酸塩、乳酸塩、脂肪酸塩、酸性アミノ酸塩、ヒログルタミン酸塩等の有機酸塩等の生理学的に許容される塩をあげることができる。これらの塩は二種以上を組み合わせ使用することもできる。

本発明の、上記一般式(1)で表されるペプチド誘導体は、例えば以下のようにして合成することができる。まず、保護塩基性アミノ酸とカルボキシル基がアミド化された中性アミノ酸とを塩化メチレン中水溶性カルボジイミドにより縮合させた後、酸処理等により主鎖の保護基のみを除去した保護ジペプチドを得る。次に、この保護ジペプチドと側鎖にナフチルメチル基等のアリール基を有するN末端保護アミノ酸誘導体とを塩化メチレン中水溶性カルボジイミドにより縮合させ、得られる保護トリペプチドをパラジウム炭素触媒下で還元すること等により保護基を除去し、目的のペプチド誘導体を得る。また、N末端のみ脱保護した保護トリペプチドに酸無水物、酸塩化物、ハロゲン化アルキル、エポキシアルカンまたはアルキルグリシジルエーテルを反応させた後にパラジウム炭素触媒下で還元脱保護すること等により、N末端アミノ基をアシル化、アルキル化、ヒドロキシアルキル化または3-アルコキシ-2-ヒドロキシプロピル化した種々の誘導体を得ることができる。

また、カルボキシル基がアミド化された中性アミノ酸の代わりに、カルボキシル基がベンジル基で保護された中性アミノ酸を用い同様にして得られる保護トリペプチドを接触還元することにより、C末端がカルボン酸であるトリペプチドを得ることができる。さらに、塩基性アミノ酸側鎖の保護基や、カルボキシル基の保護基であるベンジル基を除去する前の段階で、同様にしてN末端アミノ基をアシル化、アルキル化、ヒドロキシアルキル化または3-アルコキシ-2-ヒドロキシプロピル化した後に接触還元することにより種々の誘導体を得ることができる。また、さらにこのペプチド誘導体にアルコールを酸触媒下脱水縮合すること

により種々のC末端カルボン酸エステル誘導体を得ることができる。

さらに、主鎖のアミノ基と塩基性アミノ酸の側鎖が保護され、C末端がカルボン酸であるトリペプチドとアルキルアミンを脱水縮合反応させまたはエボキシアルカンもしくはアルキルグリシジルエーテルと付加反応させた後、同様に接触還元することにより、C末端カルボキシル基をエステル化またはアミド化した誘導体を得ることができる。

メラノサイト刺激ホルモン(MSH)阻害能を有する化合物についての、本発明にいうcAMP産生50%阻害濃度(IC50)は、以下のようにして測定され、定義されるものである。

すなわち、B16メラノーマ細胞を12穴プレートに1穴あたり $1 \times 10^4$  cellsになるように蒔き、37℃で5%CO<sub>2</sub>存在下に48時間培養する。培養後、1穴あたり1mlの無血清培地(血清を含有しないD-MEM培地)で洗ったのち、1mM 3-イソブチルー1-メチルキサンチン、10nMメラノサイト刺激ホルモン、および被検化合物を種々の濃度で含む無血清培地を1穴あたり1ml添加し、37℃で5分間インキュベートする。インキュベート後、培地をプレートから完全に除去し、そこに氷冷した2.5%過塩素酸を1ml正確に加え、そのまま氷冷下で30分インキュベートして細胞内のcAMPを抽出する。インキュベート後、1穴あたり90mlの4.2M水酸化カリウム溶液を添加して抽出液を中和する。

中和した抽出液を、4℃において12,000rpmで10分間遠心し、上清中のcAMP量を「Biotrak cAMP EIA System」(アマシャムファルマシアバイオテク社製)を用いて以下の様に定量する。なお、操作は全て5℃以下で行う。まず、0~3200fMになるようにcAMP標品を調製し、96穴マイクロプレートに100μlずつ入れる。ついで、0.05M酢酸バッファー(pH5.8、0.02%血清、および0.01%防腐剤含有)200μlをNSBウェル(Non-specific Binding Well)に、100μlをブランクウェルに入れる。評価

するサンプル100 $\mu$ lをサンプルウェルに入れる。ブランクウェルとNSBウェルを除いたすべてのウェルに抗血清100 $\mu$ l入れる。96穴マイクロプレートに蓋をし、ゆっくり振とうし、3~5℃で2時間インキュベートする。インキュベート後、ブランクウェル以外のすべてのウェルにcAMPパーオキシダーゼ50 $\mu$ lを加える。蓋をし、3~5℃で1時間インキュベートする。インキュベート後、すべてのウェルを0.01Mリン酸バッファー（pH7.5、0.05%「Tween20」含有）400 $\mu$ lを使い4回洗浄する。ウェル内に残った液は、プレートをウェル開口部を下向きにして紙の上に叩くようにし取り除く。

150 $\mu$ lの酵素基質をすべてのウェルに加え、15~30℃で1時間振とうする。振とう後、1M硫酸100 $\mu$ lをそれぞれのウェルに加え、450nmの吸光度を測定する。cAMP標品の吸光度から検量線を作成し、サンプルのcAMP量を定量する。

上記方法にて得られた10nMメラノサイト刺激ホルモンによるcAMP産生に対する被検化合物の50%阻害濃度をnM単位で表した場合の値を、cAMP産生50%阻害濃度（IC50）と定義する。

本発明のcAMP産生50%阻害濃度（IC50）が100nM以下であるメラノサイト刺激ホルモン阻害化合物のうち、美白剤として用いるには、特に紫外線による色素沈着を抑制するものが好ましい。

また、本発明のcAMP産生50%阻害濃度（IC50）が100nM以下であるメラノサイト刺激ホルモン阻害化合物は、経皮吸収性、腸管吸収性、溶解性、製造のしやすさなどの面から、好ましくは分子量が800以下、さらに好ましくは分子量が200~600のものである。

前記一般式(1)で表されるペプチド誘導体またはその塩を有効成分とする、本発明のメラノサイト刺激ホルモン阻害剤、美白剤、免疫機能調節剤、食欲調節剤、化粧料および皮膚外用剤は、適宜、経口又は非経口投与するものとして調製できる。この場合、cAMP産生50%阻害濃度（IC50）が100nM以下であ



るメラノサイト刺激ホルモン阻害能を有する化合物を用いることにより、顕著に良好な効果を得ることができる。また、皮膚に作用させることを目的とする場合は、例えば塗布により直接投与するように調製され、この場合、化粧品または皮膚外用剤に本発明のペプチドおよびその塩から選ばれる少なくとも一種または cAMP 産生 50% 阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) が 100 nM 以下であるメラノサイト刺激ホルモン阻害化合物を配合することにより調製される。

この場合、化粧品への本発明の新規ペプチド誘導体およびその塩から選ばれる少なくとも一種または cAMP 産生 50% 阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) が 100 nM 以下であるメラノサイト刺激ホルモン阻害化合物の配合量としては、化粧品の全量に占める割合として通常 0.01~10 重量%で、好ましくは 0.1~5 重量%添加するのがよい。本発明の皮膚外用剤への配合量としては、通常 0.01~50 重量%で、好ましくは 0.1%~20 重量%添加が適当である。0.01 重量%未満では添加効果が発揮されず好ましくない。また、50 重量%を超えると皮膚に対してきしみ感が生じる等使用感に問題があり好ましくない。

本発明のペプチド誘導体およびその塩から選ばれる少なくとも一種または cAMP 産生 50% 阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) が 100 nM 以下であるメラノサイト刺激ホルモン阻害化合物を化粧品あるいは皮膚外用剤に配合して使用する際、一般に化粧品あるいは皮膚外用剤として使用されている成分を、本発明の効果を阻害しない範囲で添加することができる。一般に化粧品あるいは皮膚外用剤に使用されている成分としては、油性原料、界面活性剤、溶剤、保湿剤、高分子物質、粉体物質 (粉末物質)、色素類、香料、その他の常用成分等を挙げることができる。

油性原料としては、動植物油等の油脂類、ラノリン等のロウ類、パラフィン等の炭化水素、セタノール等の高級アルコール類、ステアリン酸等の高級脂肪酸、ステロール類、レシチン等のリン脂質類、ミリスチン酸等の合成エステル類、金属石鹸、シリコーン油等を挙げることができる。

界面活性剤としては、アニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤、両性界面活性剤、非イオン界面活性剤、乳化・可溶化剤等を挙げることができる。

溶剤としては、エタノール等の低級アルコール類、エーテル類、グリセリン類、液状非イオン界面活性剤、液状油性原料、その他の有機溶剤、水等を挙げることができる。

保湿剤としては、グリセリン等の多価アルコール類、ピロリドンカルボン酸等の有機酸塩類、尿素、ヒアルロン酸等のムコ多糖類、プロリン等のアミノ酸塩類等を挙げることができる。

高分子物質としては、コラーゲン等の天然高分子化合物、部分脱アセチル化キチン等の半合成高分子化合物、カルボキシメチルセルロース等の合成高分子化合物等を挙げることができる。

粉末物質としては、タルク等の無機顔料、合成マイカ等の機能性顔料、微粒子複合粉体（ハイブリッドファインパウダー）、二酸化チタン被覆雲母等の真珠光沢顔料、ホトクロミック顔料、ナイロンパウダー等の高分子粉体、Nε-ラウロイルリジン等の有機粉体等を挙げることができる。

色素類としては、法定タール色素第一類、法定タール色素第二類、法定タール色素第三類、染毛剤、天然色素、鉱物性色素等を挙げることができる。

香料としては、ジャコウ等の動物性香料、ジャスミン油等の植物性香料、 $\alpha$ -アミルシンナムアルデヒド等の合成香料、調合香料等を挙げることができる。

化粧品あるいは皮膚外用剤におけるその他の常用成分としては、防腐・殺菌剤、酸化防止剤、紫外線吸収剤、キレート剤、褪色防止剤、緩衝剤、にきび用薬剤、ふけ・かゆみ防止剤、制汗防臭剤、熱傷用薬剤、抗ダニ・シラミ剤、角質軟化剤、乾皮症用薬剤、抗ウイルス剤、経皮吸収促進剤、ホルモン類、ビタミン類、アミノ酸・ペプチド類、タンパク質類、収れん剤、抗炎症剤、清涼・刺激剤、動植物由来成分、メラニン合成阻害剤（美白剤）、抗生物質、抗真菌剤、育毛剤等を挙げることができる。

本発明のメラノサイト刺激ホルモン阻害剤、美白剤、免疫機能調節剤、食欲調節剤、化粧品および皮膚外用剤の剤型は特に制限されず、溶液状、ペースト状、ゲル状、固体状、顆粒状、粉末状、カプセル、エアゾル等の適当な剤型をとるこ

とができる。より具体的には、例えば、オイル、ローション、クリーム、乳液、ゲル、シャンプー、ヘアリンス、ヘアコンディショナー、エナメル、ファンデーション、リップスティック、おしろい、パック、軟膏、錠剤、注射液、顆粒、カプセル、香水、パウダー、オーデコロン、歯磨、石鹸、エアゾル、クレンジングフォーム等の剤型で用いることができる。

また、本発明のメラノサイト刺激ホルモン阻害剤、美白剤、免疫機能調節剤、食欲調節剤、化粧品および皮膚外用剤は皮膚老化防止改善剤、皮膚炎症防止改善剤、浴用剤、養毛剤、皮膚美容液、日焼け防止剤、色素性乾皮症・日光蕁麻疹等の光線過敏症の防止改善剤、光アレルギーの防止改善剤、光免疫抑制の防止改善剤あるいは、外傷・あかぎれ・ひびわれ等による肌荒れの防止改善剤等に用いることができる。

さらにまた、本発明のメラノサイト刺激ホルモン阻害剤または美白剤は、紫外線による色素沈着の予防や改善及び肝斑、雀卵斑や老人性色素斑の予防や治療に有用である。

また、本発明のメラノサイト刺激ホルモン阻害剤は、免疫異常症、免疫不全症等メラノサイト刺激ホルモンが関与する各種疾患の予防・治療薬あるいは、食欲調節による体重制御を目的として用いることができる。

#### (図面の簡単な説明)

第1図は、生体におけるメラノサイト刺激ホルモン阻害試験の結果を示す(試験例4)。

#### (発明を実施するための最良の形態)

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

尚、以下の実施例において、配合量は重量%で表し、またナフチルアラニル基またはナフチルアラニンを用いることをNa1と略記する。

合成例1 : D-1-Nal-Arg-LeuNH<sub>2</sub>

Boc-Arg (Z<sub>2</sub>) (5 g、9.22 mmol) を塩化メチレン75 ml に溶解し氷冷下、水溶性カルボジイミド塩酸塩 (1.77 g、9.22 mmol)、HOBT (1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、1.25 g、9.22 mmol) を加えた。そこへ、LeuNH<sub>2</sub>塩酸塩 (1.61 g、9.68 mmol) およびトリエチルアミン (1.91 g、18.9 mmol) の塩化メチレン溶液75 ml を10分かけて滴下した後、室温に戻し終夜攪拌した。反応液を減圧濃縮した後、残渣に酢酸エチルを加え、5%クエン酸、5%炭酸水素ナトリウムおよび飽和食塩水で順次洗浄した。硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧乾燥により Boc-Arg (Z<sub>2</sub>) -LeuNH<sub>2</sub> (5.8 g、8.86 mmol) を得た。

得られた Boc-Arg (Z<sub>2</sub>) -LeuNH<sub>2</sub> (2 g、3.1 mmol) をトリフルオロ酢酸10 ml で処理することにより Arg (Z<sub>2</sub>) -LeuNH<sub>2</sub> (1.28 g、2.3 mmol) を得た。次に、得られた Arg (Z<sub>2</sub>) -LeuNH<sub>2</sub> (1.28 g、2.3 mmol) と Z-D-1-Nal (0.803 g、2.3 mmol) を同様にして縮合させ Z-D-1-Nal-Arg (Z<sub>2</sub>) -LeuNH<sub>2</sub> (1.63 g、1.84 mmol) を得た。次に、得られた Z-D-1-Nal-Arg (Z<sub>2</sub>) -LeuNH<sub>2</sub> (1.63 g、1.84 mmol) をメタノール1000 ml に溶解させ、パラジウム炭素触媒下で還元することにより D-1-Nal-Arg-LeuNH<sub>2</sub> (0.80 g、1.66 mmol) を得た。

合成例2 : D-2-Nal-Arg-LeuNH<sub>2</sub>

Z-D-1-Nal の代わりに Z-D-2-Nal を用いた以外は合成例1と同様にして D-2-Nal-Arg-LeuNH<sub>2</sub> を得た。

合成例3 : L-1-Nal-Arg-LeuNH<sub>2</sub>

Z-D-1-Nal の代わりに Z-L-1-Nal を用いた以外は合成例1と

同様にしてL-1-Nal-Arg-LeuNH<sub>2</sub>を得た。

合成例4：L-2-Nal-Arg-LeuNH<sub>2</sub>

Z-D-1-Nalの代わりにZ-L-2-Nalを用いた以外は合成例1と同様にしてL-2-Nal-Arg-LeuNH<sub>2</sub>を得た。

上記合成例で得られた化合物のマススペクトル(ESI-MS)の結果を下記第1表に示す。

第1表：ESIマススペクトル

合成例	化合物	分子量	
		計算値	測定値(MH <sup>+</sup> )
合成例1	D-1-Nal-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	483	484
合成例2	D-2-Nal-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	483	484
合成例3	L-1-Nal-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	483	484
合成例4	L-2-Nal-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	483	484

試験例1：cAMP産生50%阻害濃度(IC<sub>50</sub>)の測定

先に説明したcAMP産生50%阻害濃度(IC<sub>50</sub>)の測定法に従って、下記第2表に記載の薬剤、すなわち、D-1-Nal-Arg-LeuNH<sub>2</sub>、D-2-Nal-Arg-LeuNH<sub>2</sub>、L-1-Nal-Arg-LeuNH<sub>2</sub>およびD-Trp-Arg-LeuNH<sub>2</sub>について、それぞれのIC<sub>50</sub>を測定した。

結果を第2表に示す。同表に示すように被験薬剤はメラノサイト刺激ホルモンのcAMP上昇作用を効果的に阻害した。

第2表：メラノサイト刺激ホルモン阻害試験

被験化合物	50%阻害濃度 (IC <sub>50</sub> , nM)
D-1-Nal-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	540
D-2-Nal-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	42
L-1-Nal-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	470
D-Trp-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	230

## 試験例2：ヒトメラノサイトのメラニン生成抑制試験

対数増殖期にあるヒトメラノサイトをトリプシン処理し、「Medium 154s」（ク  
ラボウ製、増殖因子入り(HMGS)）にて $1.5 \times 10^5$ 個で6穴プレートに播種した。  
37℃で5%CO<sub>2</sub>濃度の炭酸ガスインキュベータで培養した。1日後、HBS  
(Hepes Buffer Saline)でリンスを行い培地を「MCDB153」（ウシ胎児血清、インシ  
ュリン、b-FGF、トランスフェリン、およびトコフェロール含有）に交換し、  
さらに2日間培養した。美白剤（被験化合物）を200 μM、20 μMまたは2  
μMの濃度になるように「MCDB153」（ウシ胎児血清、インシュリン、b-FGF、  
トランスフェリンおよびトコフェロール含有）+メラノサイト刺激ホルモンで調  
製し、6穴プレートに添加した。また、美白剤を添加しない「MCDB153」（ウシ胎  
児血清、インシュリン、b-FGF、トランスフェリンおよびトコフェロール含  
有）+メラノサイト刺激ホルモン、および「MCDB153」（ウシ胎児血清、インシ  
ュリン、b-FGF、トランスフェリンおよびトコフェロール含有）のみの6穴プ  
レートも同時に培養した。2日毎に2回、上記美白剤含有「MCDB153」（ウシ胎児  
血清含有）で培地交換した。

1回目の美白剤添加後、6日目にメラニン生成抑制効果の確認を行った。すな  
わち、6穴プレートの培地を吸引除去し、HBSでリンスした。その後6穴プレート  
を風乾し、1/5M NaOH 230 μlを添加してメラノサイト内のメラニンを  
溶解した。この溶解液（200 μl）をマイクロプレートリーダー（475 n

m) のAbs (吸光度) で評価した。被験化合物のメラニン生成抑制率は、下記式 (1) により算出した。結果を下記第 3 表に示す。

メラニン生成抑制率 (%)

$$= \{1 - (A_1 - A_3) / (A_2 - A_3)\} \times 100 \quad (1)$$

$A_1$  : 被験化合物及びMSHともに添加時の475nmの吸光度

$A_2$  : 被験化合物不添加、MSH添加時の475nmの吸光度

$A_3$  : 被験化合物及びMSHともに非添加時の475nmの吸光度

第 3 表 : メラニン生成抑制試験

被験化合物	添加濃度 ( $\mu$ M)	抑制率 (%)
D-1-Nal-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	20	43
	200	52
D-2-Nal-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	2	49
	20	51
	200	70
L-1-Nal-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	20	8
	200	28
D-Trp-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	20	24
	200	57

第 3 表に示すように、被験化合物はメラノサイト刺激ホルモン添加により上昇したメラノサイトのメラニン生成を効果的に抑制した。これより、被験化合物はメラノサイト刺激ホルモン誘起メラニン生成に対する抑制能を有するものであることが分かる。

#### 試験例 3 : 保存安定性試験

本発明のD-2-Nal-Arg-LeuNH<sub>2</sub>および既知のメラノサイト刺激ホルモン阻害剤であるD-Trp-Arg-LeuNH<sub>2</sub>について、各々0.1%

水溶液を調製し、4℃において6か月間保存し、着色の程度をAPHA(American Public Healthy Association)法の標準色と比較することにより、保存安定性を評価した。結果を下記第4表に示す。

第4表：保存安定性試験

	被験化合物	着色の程度(APHA標準色)
実施例	D-2-Nal-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	20
比較例	D-Trp-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	200

第4表に示すように、本発明のD-2-Nal-Arg-LeuNH<sub>2</sub>は、APHAの値が20であり、ほとんど着色していないのに対し、既存のMSH阻害剤であるD-Trp-Arg-LeuNH<sub>2</sub>は、APHA値が200であり、着色が大きい。これより本発明のD-2-Nal-Arg-LeuNH<sub>2</sub>は、良好な安定性を示すことがわかる。

#### 試験例4：生体におけるメラノサイト刺激ホルモン阻害試験（褐色モルモット色素沈着抑制試験）

以下の内容にて、被検物質の塗布と紫外線照射を繰り返し、着色度合いを測定することによりメラノサイト刺激ホルモン阻害試験を行なった。

##### 1. 被検化合物

D-2-Nal-Arg-LeuNH<sub>2</sub> (50mM 50%エタノール水にて溶解) およびD-Trp-Arg-LeuNH<sub>2</sub> (50mM 50%エタノール水にて溶解) を用い、比較対照として50%エタノール水を用いた。

##### 2. 評価動物

Weiser-Maples系褐色モルモット雄（4週令）を東京実験動物株式会社より購入し、7週間予備飼育したものをを用いた。

##### 3. 褐色モルモットの剃毛



褐色モルモットを保定器にて保定し、背部をバリカン「THRIVE MODEL 6000AD」（夏目製作所製）および「ホームバリカンセラミック ER722」（National製）及び電気シェーバー「Dual1500AC/RC」（BRAUN製）を用いて約3cm×3cmの面積をほぼ正方形に剃毛した。剃毛後の皮膚は、水を浸した脱脂綿で拭き、紙タオル「キムワイプ」（クレシア社製）で水分を取り除いた。

#### 4. テープストリッピング

ここで、粘着テープを皮膚表面に貼付した後、この粘着テープを剥がすことにより皮膚表面の角質層の一部を剥離させることを「テープストリッピング」と称する。

剃毛した褐色モルモットの背部の皮膚をエタノールを浸した脱脂綿により拭き取り、約2cm×2cmの面積の角質層を粘着テープ「Scotch 313D」（3M社製）にて5回、テープストリッピングを行なった。

なお、一か月後にも同様にテープストリッピングを行なった。

#### 5. 被検物質の塗布

テープストリッピングを行なった翌日から、下記の頻度にてサンプルを皮膚評価部位に塗布した。塗布は、「ビベットマン」（GILSON製）を用いてビベットチップで被検物質または比較対照品を伸ばすように塗布した。

①紫外線照射期間前（テープストリッピングを行なった後、5日後に紫外線照射を開始するまでの期間）：

サンプルは、1日1回、10 $\mu$ lを所定の部位に塗布した（5日間）。

②紫外線照射期間中：

毎回紫外線照射後、サンプルを所定の部位に塗布した。サンプルの塗布は1日2回（朝および夕方）、10 $\mu$ lを週5日間（月～金）塗布した（2週間）。

③紫外線照射期間後：

1日2回（朝および夕方）、10 $\mu$ lを週5日間（月～金）塗布した（40日間）。

なお、紫外線照射中のサンプルの紫外線吸収効果をなくす為、紫外線照射期間前および紫外線照射期間中のサンプルの塗布は50%エタノール群においても、被験化合物であるD-2-Nal-Arg-LeuNH<sub>2</sub>（あるいはD-Trp-Arg-LeuNH<sub>2</sub>）を塗布した。紫外線照射終了時点から50%エタノール群では50%エタノールを塗布した。

## 6. 紫外線照射

紫外線照射は、テープストリッピングを行った日から5日経過した後、1日1回、週3日間（月曜、水曜および金曜）、合計で6回行った。

紫外線照射直前には、毎回上記と同様にして褐色モルモットの背部を剃毛し、水で評価部位を洗い被検物質を取り除き、紙タオルで余分な水を取り除いた。褐色モルモットは保定器で保定し、目をアルミホイルにて保護した状態でUVBを照射した（紫外線照射装置「デルマレイM-DMR-80形」（クリニカル・サプライ））。照射条件は0.5mW×5分間で行い、紫外線強度は紫外線強度計「UVR-305/365-D(II）」（クリニカル・サプライ）にて測定して調節した。

## 7. 評価

評価は、1週間に1～2回、分光測色計「CM-2002」（ミノルタ製）にてL\*を測定して行った。ここで、L\*値はL\*a\*b\*表色系の数値の1つであり、明度を表す。L\*a\*b\*表色系は、物体の色を表す表色系として、1976年に国際照明委員会（CIE）において規格化され、日本においてもJIS（JIS Z 8729）で採用されている。

なお、評価の直前には、毎回上記と同様にして褐色モルモットの背部を剃毛し、水で評価部位を洗い被検物質を取り除き、紙タオルで余分な水を取り除いた。

結果を後掲図1に示す。図1において、縦軸はD-2-Nal-Arg-LeuNH<sub>2</sub>（またはD-Trp-Arg-LeuNH<sub>2</sub>）を塗布した評価部位のL\*値と、50%エタノールを塗布した評価部位のL\*値の差を、ΔL\*値として表した。横軸は日数を表わす。紫外線照射終了日を評価開始0日目とした。ΔL\*

値が大きいほど、色素沈着が少なく、メラノサイト刺激ホルモンを阻害していることとなる。

この結果より、cAMP産生50%阻害濃度(IC50)が100nM以下であるメラノサイト刺激ホルモン阻害能を有する化合物は、実際の生体に対しても十分なメラノサイト刺激ホルモン阻害効果を示すことがわかる。

以上の試験結果を下記第5表にまとめて示す。

第5表：MSH阻害剤評価結果

被験物質	MSH 阻害能	メラニン生成 抑制能	保存 安定性	褐色モルモット 色素沈着抑制試験
D-1-NaI-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	B	B	—	—
D-2-NaI-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	A	A	A	○
L-1-NaI-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	B	B	—	—
D-Trp-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	B	B	C	×

第5表における評価基準は、次の通りである。

- (1)MSH阻害能： 本試験における50%阻害濃度 評価  
100nM 以下 A  
101～1000nM B  
1001nM 以上 C
- (2)メラニン生成抑制能： 本試験においてメラニン生成 評価  
抑制能を示す最小濃度 A  
1～10μM B  
11～100μM C  
101μM 以上
- (3)保存安定性試験： 本試験における着色の程度 評価  
(APHA標準色) A  
20以下 B  
21～100 C  
101以上 —  
不実施

(4)褐色モルモット  
色素沈着抑制試験：

色素沈着抑制効果有り  
色素沈着抑制効果なし  
不実施

評価  
○  
×  
—

上表より、本発明の化合物が総合的に優れていることが分かる。

下記配合例 1 ～ 11 に示す配合で常法によりメラノサイト刺激ホルモン阻害剤、化粧料あるいは皮膚外用剤を調製した。

配合例 1：錠剤	重量%
D-2-Nal-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	10
乳糖	50
デンプン	20
カルボキシメチルセルロース	19
ステアリン酸マグネシウム	1

配合例 2：注射剤	重量%
D-2-Nal-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	0.1
ブドウ糖	2.0
注射用水	残部

配合例 3：軟膏剤	重量%
N-ラウロイル-D-2-Nal-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	1.0
尿素	20.0
白色ワセリン	15.0
軽質流動パラフィン	6.0
セタノール	3.0
ステアリルアルコール	5.0
モノステアリン酸グリセリル	5.0
香料	適量
防腐剤	適量
緩衝剤	1
精製水	残部

配合例 4 : クリーム	重量%
D-2-Nal-Arg-LeuOEt	1.0
コウジ酸	1.0
ステアリン酸	2.0
ポリオキシエチレン(25)セチルエーテル	3.0
モノステアリン酸グリセリル	2.0
オクチルドデカノール	10.0
セタノール	6.0
還元ラノリン	4.0
スクワラン	9.0
1,3-ブチレングリコール	6.0
ポリエチレングリコール(1500)	4.0
防腐剤	適量
香料	適量
精製水	残部

配合例 5 : クリーム	重量%
D-2-Nal-Arg-LeuOEt	1.0
アルブチン	1.0
ステアリン酸	2.0
ポリオキシエチレン(25)セチルエーテル	3.0
モノステアリン酸グリセリル	2.0
オクチルドデカノール	10.0
セタノール	6.0
還元ラノリン	4.0
スクワラン	9.0
1,3-ブチレングリコール	6.0
ポリエチレングリコール(1500)	4.0
防腐剤	適量
香料	適量
精製水	残部

配合例 6 : 乳液	重量%
D-1-Nal-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	2.0
レチノール	0.1
ミツロウ	0.5
ワセリン	2.0
モノステアリン酸グリセリル	1.0
モノオレイン酸ポリエチレングリコール	1.0
メチルポリシロキサン	2.0
セタノール	1.0
スクワラン	6.0
カルボキシビニルポリマー	0.5
1, 3-ブチレングリコール	4.0
エタノール	5.0
防腐剤	適量
香料	適量
精製水	残部

配合例 7 : ジェル	重量%
N-アセチル-D-1-Nal-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	0.1
流動パラフィン	12.0
トリ(2-エチルヘキサン酸)グリセリル	50.0
ソルビット	10.0
ポリエチレングリコール(400)	5.0
アシルメチルタウリン	5.0
ポリオキシエチレン(20)イソセチルエーテル	10.0
防腐剤	適量
香料	適量
精製水	残部

配合例 8 : 美容液	重量%
D-2-Nal-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	0.5
ジプロピレングリコール	5.0
ポリエチレングリコール(400)	5.0
エタノール	10.0
カルボキシビニルポリマー	0.5
アルギン酸ナトリウム	0.5
水酸化カリウム	0.2
モノステアリン酸ポリオキシエチレン(20)ソルビタン	1.0
モノオレイン酸ソルビット	0.5
オレイルアルコール	0.5
ブラセンタエキス	0.2
酢酸d l- $\alpha$ -トコフェロール	0.2
防腐剤	適量
香料	適量
褪色防止剤	適量
精製水	残部

配合例 9 : バック	重量%
L-1-Nal-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	3.0
ポリビニルアルコール	15.0
カルボキシメチルセルロース	5.0
1, 3-ブチレングリコール	5.0
エタノール	12.0
ポリオキシエチレン(20)オレイルエーテル	0.5
防腐剤	適量
香料	適量
緩衝剤	適量
精製水	残部

配合例 10 : ファンデーション	重量%
N-ラウロイル-L-1-Nal-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	5.0
流動パラフィン	10.0
モノオレイン酸ポリオキシエチレン(20)ソルビタン	3.5
プロピレングリコール	3.0
酸化チタン	9.0
カオリン	24.0
タルク	42.0
着色顔料	3.0
防腐剤	適量
香料	適量
精製水	残部

配合例 11 : 洗顔料	重量%
L-1-Nal-Arg-LeuNH <sub>2</sub>	0.5
N-ラウロイルグルタミン酸トリエタノールアミン塩	25.0
ラウリン酸トリエタノールアミン	5.0
ポリオキシエチレン(4)ポリオキシプロピレン(11)ブチルエーテル	5.0
エタノール	3.0
防腐剤	適量
香料	適量
精製水	残部

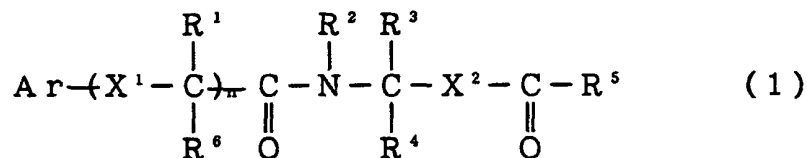
(産業上の利用可能性)

本発明のペプチド誘導体およびメラノサイト刺激ホルモン阻害剤は、メラノサイト刺激ホルモンの働きを阻害し、延いては色素沈着を防止し、あるいは免疫異常症や免疫不全症の予防、改善または治療し、あるいは食欲調節による体重の制御をすることができ、化粧品や皮膚外用剤として用いることができ、しかも容易に製造でき、かつ保存安定性に優れる。

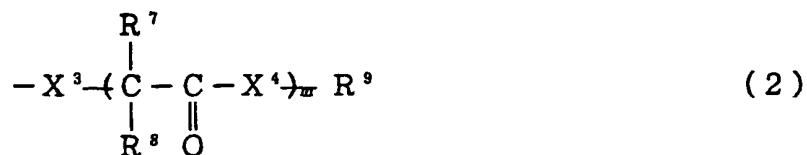


## 請求の範囲

1. 下記一般式(1)で表されることを特徴とするナフチル基を有するジまたはトリペプチド誘導体またはその塩。



(式中、Arは、置換基を有していてもよいナフチル基を、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>は、それぞれ独立に水素原子または置換基を有していてもよい炭素原子数1～6の直鎖若しくは分岐のアルキル基を、R<sup>4</sup>は、水素原子、置換基を有していてもよい、アミノ酸の側鎖、アミノ基、アミジノ基、グアニジル基、炭素原子数1～6の直鎖若しくは分岐のアミノアルキル基、炭素原子数1～6の直鎖若しくは分岐のアミジノアルキル基、炭素原子数1～6の直鎖若しくは分岐のグアニジノアルキル基または炭素原子数6～12のアミジノアリール基を、X<sup>1</sup>は、存在しないかまたは炭素原子数1～6のアルキレン基、置換基として炭素原子数1～6の直鎖若しくは分岐のアルキル基を有していてもよい炭素原子数0～6のアミノアルキレン基、または炭素原子数1～6の直鎖若しくは分岐のオキシアルキレン基を、X<sup>2</sup>は、存在しないかまたは炭素原子数1～6の直鎖若しくは分岐のアルキレン基を、R<sup>6</sup>は、水素原子または-NHYを、Yは水素原子、炭素原子数2～22のアシル基、炭素原子数1～22のアルキル基、炭素原子数1～22のヒドロキシアルキル基、または炭素原子数1～22のアルコキシ基を有する3-アルコキシ-2-ヒドロキシプロピル基を、nは、0または1の整数を、そしてR<sup>5</sup>は、下記一般式(2)で表される基を示す。



式中、X<sup>3</sup>は、-O-または-NR<sup>10</sup>-を、X<sup>4</sup>は、-O-または-NR<sup>11</sup>-を、R<sup>7</sup>は、水素原子、アミノ酸の側鎖または炭素原子数1～6の直鎖若しくは分岐

のアルキル基を、 $R^8$ 、 $R^{10}$ および $R^{11}$ は、それぞれ独立に水素原子または炭素原子数1～6の直鎖若しくは分岐のアルキル基を、 $R^9$ は、水素原子、炭素原子数2～22のアシル基、炭素原子数1～22のアルキル基、炭素原子数1～22のヒドロキシアルキル基、または炭素原子数1～22のアルコキシル基を有する3-アルコキシ-2-ヒドロキシプロピル基を、そしてmは0または1の整数を表す。)

2. 一般式(1)のArが1-ナフチル基又は2-ナフチル基で、 $R^1$ 、 $R^2$ および $R^3$ がいずれも水素原子で、 $R^4$ がアミノ基またはグアニジル基を有する塩基性アミノ酸の側鎖で、 $X^1$ がメチレンで、 $X^2$ が存在せず、 $R^6$ が-NHYで、Yが水素原子、炭素原子数2～22のアシル基、炭素原子数1～22のアルキル基、炭素原子数1～22のヒドロキシアルキル基または、炭素原子数1～22のアルコキシ基を有する3-アルコキシ-2-ヒドロキシプロピル基で、nが1で、 $R^5$ が一般式(2)で表される基であり、一般式(2)の $X^3$ が-O-または-NH-で、 $X^4$ が-O-または-NH-で、 $R^7$ がアミノ酸の側鎖、水素原子または炭素原子数1～6の直鎖若しくは分岐のアルキル基で、 $R^8$ が水素原子で、 $R^9$ が水素原子、炭素原子数2～22のアシル基、炭素原子数1～22のアルキル基、炭素原子数1～22のヒドロキシアルキル基、または炭素原子数1～22のアルコキシル基を有する3-アルコキシ-2-ヒドロキシプロピル基で、そしてmが0または1の整数であることを特徴とする請求項1記載のペプチド誘導体またはその塩。

3. 一般式(1)で表されるペプチド誘導体がD-1-ナフチルアラニル-Arg-LeuNH<sub>2</sub>、D-2-ナフチルアラニル-Arg-LeuNH<sub>2</sub>、L-1-ナフチルアラニル-Arg-LeuNH<sub>2</sub>またはL-2-ナフチルアラニル-Arg-LeuNH<sub>2</sub>であることを特徴とする請求項1または2記載のペプチド誘導体またはその塩。

4. 請求項1～3のいずれかに記載のペプチド誘導体またはその塩から選ばれる少なくとも一種を有効成分として含有することを特徴とするメラノサイト刺

激ホルモン阻害剤。

5. cAMP産生50%阻害濃度(IC50)が100nM以下であるメラノサイト刺激ホルモン阻害能を有する化合物を有効成分として含有することを特徴とするメラノサイト刺激ホルモン阻害剤。

6. 紫外線による色素沈着を抑制することを目的とすることを特徴とする請求項5に記載のメラノサイト刺激ホルモン阻害剤。

7. メラノサイト刺激ホルモン阻害能を有する化合物が分子量が800以下であることを特徴とする請求項5又は6に記載のメラノサイト刺激ホルモン阻害剤。

8. 請求項1～3のいずれかに記載のペプチド誘導体またはその塩から選ばれる少なくとも一種または請求項4～7のいずれかに記載のメラノサイト刺激ホルモン阻害剤の少なくとも一種を有効成分として含有することを特徴とする美白剤。

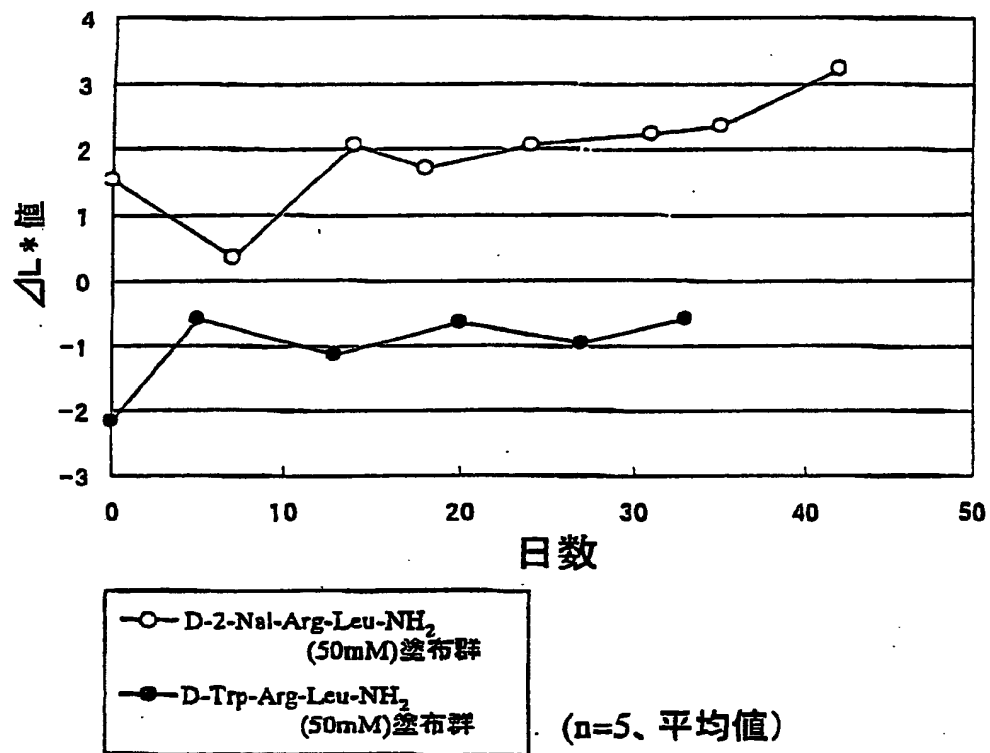
9. 請求項1～3のいずれかに記載のペプチド誘導体またはその塩から選ばれる少なくとも一種または請求項4～7のいずれかに記載のメラノサイト刺激ホルモン阻害剤の少なくとも一種を有効成分として含有することを特徴とする免疫機能調節剤。

10. 請求項1～3のいずれかに記載のペプチド誘導体またはその塩から選ばれる少なくとも一種または請求項4～7のいずれかに記載のメラノサイト刺激ホルモン阻害剤の少なくとも一種を有効成分として含有することを特徴とする食欲調節剤。

11. 請求項1～3のいずれかに記載のペプチド誘導体またはその塩から選ばれる少なくとも一種または請求項4～7のいずれかに記載のメラノサイト刺激ホルモン阻害剤の少なくとも一種を有効成分として含有することを特徴とする化粧料または皮膚外用剤。



図 1



$\Delta L^* \text{ 値 (} \text{---} \bigcirc \text{---}) = L^* \text{ 値 (D-2-Nal-Arg-Leu-NH}_2 \text{ 塗布)} - L^* \text{ 値 (エタノール塗布)}$

$\Delta L^* \text{ 値 (} \text{---} \bullet \text{---}) = L^* \text{ 値 (D-Trp-Arg-Leu-NH}_2 \text{ 塗布)} - L^* \text{ 値 (エタノール塗布)}$



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 22 November 2000 (22.11.00)	
<b>International application No.</b> PCT/JP00/02687	<b>Applicant's or agent's file reference</b> DF40PCT/B558
<b>International filing date</b> (day/month/year) 25 April 2000 (25.04.00)	<b>Priority date</b> (day/month/year) 26 April 1999 (26.04.99)
<b>Applicant</b> SHIOJIRI, Eiji et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
 18 August 2000 (18.08.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
 \_\_\_\_\_

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer R. Forax Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

